

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平9-286797

(43)公開日 平成9年(1997)11月4日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 14/745			C 07 K 14/745	
A 61 K 38/55	ACB		1/16	
	ADA		1/18	
C 07 K 1/16			1/22	
1/18			1/30	

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全5頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-97040	(71)出願人	000137764 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号
(22)出願日	平成8年(1996)4月18日	(72)発明者	瓜生 勝寛 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字中央研究所内
		(72)発明者	大水 章正 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字中央研究所内
		(72)発明者	上村 八尋 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字中央研究所内
		(74)代理人	弁理士 高島 一

(54)【発明の名称】 ヘパリンコファクターII及びその精製方法

(57)【要約】

【解決手段】 ヘパリンコファクターII (HCII) を含有する溶液を、ヘパリンーセファロースを用いて処理した後、ポリエチレングリコール分画処理に付す。陰イオン交換クロマトグラフィー処理に付した後、陽イオン交換クロマトグラフィー処理に付して、HCIIを精製する。

【効果】 HCIIの回収率が約52%以上となるとともに、HCIIの比活性が少なくとも約10U/A_{280nm}となり、ほぼ純品に近いものが回収され、工業的な大規模製造に適する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 比活性が少なくとも約10U/A_{280nm}のヘパリンコファクターII。

【請求項2】 ヘパリンコファクターIIを含有する溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィー処理に付した後、陽イオン交換クロマトグラフィー処理に付すことを特徴とするヘパリンコファクターIIの精製方法。

【請求項3】 陰イオン交換クロマトグラフィー処理の前にポリエチレングリコール分画処理に付すことを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】 陰イオン交換クロマトグラフィー処理の前に固相化ヘパリン処理に付すことを特徴とする請求項2又は3記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、高比活性を有するヘパリンコファクターII（以下「HCII」という。）及びその精製方法に関する。

【0002】

【発明の背景】 HCIIは、分子量66,000で一本鎖の糖蛋白質であり、その生理機能はまだ確立されていないが、アンチトロンビンIII（以下「ATIII」という。）とは作用部位が異なり、トロンビンを特異的に阻害する抗凝固物質である。HCIIは、血管内よりも血管外におけるトロンビン阻害物質として機能していると思われ、また創傷治癒に関与している可能性も示唆されている。

【0003】

【従来の技術】 HCIIを精製する方法としては、実験室規模のものが知られているが、回収率、比活性などの点で工業的な大規模製造に必ずしも適用できるものではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、高比活性を有するHCIIを提供すること、及び当該HCIIを高い回収率で得ることができ、従って工業的な大規模製造に適するHCIIの精製方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、HCIIを高い回収率で回収すべく鋭意研究を行った結果、本発明を完成させるに至った。即ち、本発明のHCIIの精製方法は、HCIIを含有する溶液を、陰イオン交換クロマトグラフィー処理に付した後、陽イオン交換クロマトグラフィー処理に付すことを特徴とする。本発明においては、陰イオン交換クロマトグラフィー処理の前に、ポリエチレングリコール分画処理及び／又は固相化ヘパリン処理に付すことが好ましい。

【0006】 本発明で使用されるHCIIを含有する溶液として、好ましくは血漿蛋白含有物が例示される。この場合、例えば血漿そのもの、好ましくは血漿をHCIIが含まれる程度に適当な精製処理を施したものと、変換処

理の原料として使用することができる。具体的には、ヒト血漿分画、例えばコーン分画法による上清Iもしくは上清II+III、クエン酸又はヘパリン含有血漿から血液凝固第VIII因子を回収した後の残留分画、脱クリオ血漿などが用いられる。血漿の由来も特に問わず、例えばウシ由来のもの、ヒト由来のものなどが挙げられるが、好ましくはヒト由来のものである。

【0007】 HCIIを含有する溶液は、固相化ヘパリンに接触させて、HCIIを上記ヘパリンに結合させるのが好ましい。固相化ヘパリンは、例えば多糖類、シリカゲル、線維よりなる不溶性の支持体などの固相に結合された单量体ヘパリンである。支持体の例としては、寒天、アガロース、架橋アガロース、セルロース、シリカ、ナイロン、親水性のビニルポリマー、その他当該分野で公知のものが挙げられる。なお、かかる固相化ヘパリン処理は、陰イオン交換クロマトグラフィー処理の前に限らず、いずれの工程において行ってもよい。

【0008】 HCIIを含有する溶液は、0°C以下、好ましくは-6~-4°C、より好ましくは約-5°Cで固相化

10 へパリンに接触させる。この処理をカラム方式で行い、リガンドであるヘパリンに結合したHCIIを上清II+IIIなどのHCII含有溶液から分離することができる。

【0009】 HCIIは、0.1~0.2Mの塩化ナトリウムを含む緩衝溶液などで洗浄した後に、特に好ましくは段階的に塩濃度を上げて洗浄操作を繰り返した後に、

0.3~1.0M、好ましくは0.3~0.6M、さらに好ましくは0.4~0.5Mの塩化ナトリウムを含む緩衝液に接触させるなどの方法により、固相化ヘパリンから溶出される。当該緩衝液のpHは、6~8に設定する。

【0010】 一実施態様においては、コーン分画法による上清II+IIIをヘパリンーセファロース（Pharmacia社製）や heparin-Actigel Superflow (Sterogene社製)などの固相化ヘパリンとともにバッヂ吸着法で懸濁させ、この懸濁液を0°C以下、好ましくは-6~-1°Cの低温で保温する。固相化ヘパリンを血漿分画に接触させる前に、例えば20%エタノール溶液などのアルコール含有溶液でヘパリンーセファロースを洗浄する。他に洗浄溶液としては、25%エタノール溶液が好適である。その後、上記ヘパリンーセファロースを液相から分離する。

40 【0011】 別の実施態様では、ヘパリンー固相マトリクスをカラムに充填し、血漿アルコール分画を上記カラムに通す。ここでも、固相化ヘパリンを、カラム充填前後に例えば20~25%のエタノール溶液などのアルコール含有溶液で洗浄する。

【0012】 本発明の精製方法においては、未処理のHCII含有溶液又は固相化ヘパリンに接触させたHCII含有溶液を陰イオン交換クロマトグラフィー処理に付す。用いられる陰イオン交換体としては、DEAE系（DE

AE-セファデックス、DEAE-セルロース、DEAE-セファロースなど)、QAE系 (QAE-セファデックス、QAE-セルロース、QAE-セファロースなど) が例示される。

【0013】陰イオン交換クロマトグラフィー処理における、陰イオン交換体の平衡化及び洗浄には、0.005~0.01Mのクエン酸緩衝液 (pH 6~8程度)、又は0.005~0.01Mのリン酸緩衝液 (pH 6~8程度)などを用いることによって行われる。また、陰イオン交換体からのHCIIの溶出は、平衡化及び洗浄に用いられる緩衝液であって、0.05~0.2M、好ましくは0.1~0.15Mの塩化ナトリウムを含有するものを用いる。

【0014】上記の陰イオン交換クロマトグラフィー処理により得られた処理物は、次に陽イオン交換クロマトグラフィー処理に付される。用いられる陽イオン交換体としては、スルホエチル型 (スルホエチルーガロースなど)、スルホプロピル型 (スルホプロピルーガロースなど)、カルボキシメチル型 (カルボキシメチルーガロースなど)、アンバーライトIRC50などが例示される。

【0015】陽イオン交換クロマトグラフィー処理は、上記の陰イオン交換クロマトグラフィー処理と同様に行われる。具体的には、陽イオン交換体の平衡化及び洗浄には、0.01~0.05Mのクエン酸緩衝液 (pH 6~8程度)、又は0.01~0.05Mのリン酸緩衝液 (pH 6~8程度)などが用いられ、陽イオン交換体からのHCIIの溶出には、平衡化及び洗浄に用いられる緩衝液であって、0.1~0.3M、好ましくは0.15~0.2Mの塩化ナトリウムを含有するものが用いられる。

【0016】以上の処理を経ることにより精製HCIIを得ることができるが、本発明の精製方法においては、さらにゲルろ過することができる。ゲルとしては、セファデックス、バイオゲル、アガロースゲル、Sephacrylなどが挙げられる。ゲルろ過には、0.1~0.3M、好ましくは0.15~0.2Mの塩化ナトリウムを含有する0.01~0.05Mのクエン酸緩衝液 (pH 6~8程度)が用いられる。

【0017】また、上記の陰イオン交換クロマトグラフィー処理、陽イオン交換クロマトグラフィー処理、及びゲルろ過の各処理の前に、HCII含有溶液 (処理されたものを含む) を限外ろ過、ポリエチレングリコール分画処理、硫酸分画などにより脱塩、濃縮することが好ましい。

【0018】ポリエチレングリコール分画処理は、15~30% (w/v)、好ましくは18~25% (w/v) のポリエチレングリコールを用いて行われ、特に陰イオン交換クロマトグラフィー処理前にポリエチレングリコール分画処理を行うことが好ましい。

【0019】上記の処理により、精製HCIIを得ることができ、比活性が少なくとも約10U/A_{280nm} (「A_{280nm}」は、波長280nmで吸光度を測定して求められた蛋白量を示す。) の高比活性を有するHCIIを得ることができる。

【0020】HCIIの比活性は、例えばテストチームAT-III・2キット (KABI社製) を用いた合成基質法により、次のようにして測定できる。試料又は標準液 (0.001~0.01U/ml) 50μlにトロンビン1000μlを添加した後、37℃で5分間インキュベーションする。さらに発色性合成基質 (H-D-フェニルアラニル-L-ピペコリル-L-アルギニル-p-ニトロアニリド・二塩酸塩) 100μlを添加した後、37℃で5分間インキュベーションする。反応停止液 (クエン酸) 1.0mlを添加し、波長405nmで吸光度を測定して、検量線 (標準曲線) よりHCIIの活性を求める。そして、A_{280nm} 値当たりのHCIIの比活性を求めた。

【0021】当該HCIIは自体公知の手法にて製剤化することにより、高比活性を有するHCII製剤とができる。この際、必要に応じて、医薬上許容される担体、添加剤などの添加及び加熱、滅菌、除菌ろ過処理、分注小分け、凍結乾燥処理などが通常の方法に準じて行われる。

【0022】

【実施例】本発明を以下の実施例により詳述するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

【0023】実施例1

コーンらの開示 (J. Am. Chem. Soc., 72, 465 (1950))

30 に従って、-4℃~-6℃でヒト血漿500mlからコーン分画法による上清II+IIIを得た。ヘパリンアフィニティーコロマトグラフィー [ヘパリン-TOYOPEARL (Heparin-TOYOPEARL)] を、-6℃~-4℃で0.01Mのクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で洗浄し、-6℃で100mlのカラムに充填した。コーン分画法による上清II+IIIを上記カラムに通した後、0.4Mの塩化ナトリウムを含む0.01Mのクエン酸ナトリウム水溶液 (pH 6.8) を用いて溶出画分を得た。

【0024】0.4M-NaCl溶出画分を限外ろ過

40 [フィルトロン、ミニセット (3万カット)] により脱塩、濃縮した後、以下のようにして陰イオン交換クロマトグラフィー処理に付した。陰イオン交換体としてのDEAE-Sephadex F F (500ml, Pharmacia社製) をカラムに充填し、0.01Mのクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 500mlにてカラムを平衡化した。脱塩、濃縮された上記画分をカラムに通した後、0.01Mのクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 750mlを用いて洗浄した。0.10Mの塩化ナトリウムを含む0.01Mのクエン酸ナトリウム水溶液 (pH 7.2) 500mlを用いて溶出させ、得られた溶出

液を上記と同様に脱塩、濃縮した。

【0025】次に、脱塩、濃縮された溶出液を以下のようにして陽イオン交換クロマトグラフィー処理に付した。陽イオン交換体としてのSP-TOYOPEARL

C550 (500ml、TOSOH社製) をカラムに充填し、0.01Mのクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 1500mlにてカラムを平衡化した。脱塩、濃縮された上記溶出液をカラムに通した後、0.01Mのクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 1500mlを用いて洗浄した。0.15Mの塩化ナトリウムを含む0.01Mのクエン酸ナトリウム水溶液 (pH 7.2) 1500mlを用いて溶出させ、得られた溶出液を上記と同様に脱塩、濃縮した。

【0026】さらに、Sephacryl S-200HR (Phar *

工 程	H C II回収率 (%)	H C II比活性 (U/A _{280nm})
コーン分画法による上清II+IIIの0.4M-NaCl溶出画分	100	0.14
陰イオン交換クロマトグラフィー0.10M-NaCl溶出液	72.6	2.41
陽イオン交換クロマトグラフィー0.15M-NaCl溶出液	78.0	7.52
ゲルろ過による H C II画分 (第3画分) (第4画分)	29.2 35.3	8.83 9.57

【0029】H C II画分のSDS-PAGE分析をAT IIIを対照として行った。具体的には、泳動用ゲルとして4/20 SDS-PAGE (第一化学薬品社製) を用いて還元及び非還元下で常法に従って分析を行った。その結果、対照のAT IIIが分子量約64kDであるのに対し、H C IIの第3及び第4画分は72kDであった。

【0030】また、G3000SW_n (TOSOH社製) を用いて常法に従ってHPLC分析を行った。その結果、純度は96.3% (第3画分)、92.0% (第4画分) であった。

【0031】実施例2

実施例1において、0.4M-NaCl洗浄画分を25% (w/v) ポリエチレンギリコール分画 (pH 7.2) ※

* macia 社製) によりゲルろ過を行い、精製されたH C II画分を得た。なお、各クロマトグラフィー担体については、平衡化前に0.2Nの水酸化ナトリウム水溶液にて洗浄した。

【0027】以上の各精製工程におけるH C IIの回収率及び比活性を表1にまとめた。H C IIの回収率は、コーン分画法による上清II+IIIの0.4M-NaCl洗浄画分の蛋白量 (A_{280nm}) を100%として表した。H C IIの活性は、テストチームAT-III・2キット (KABI社製) を用いて、AT-III活性測定法に準じて行った。なお、分光光度計としてU-3210 (HITACHI社製) を用いた。

【0028】

【表1】

※±0.1) して脱塩、濃縮する以外は、実施例1と同様にして精製されたH C II画分を得た。なお、ポリエチレンギリコール分画の沈殿は、0.01Mのクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 500mlにて溶解し、DEAE-Sepharose FF (100ml) に通した。また、DEAE-Sepharose FFカラムからの溶出は、0.15Mの塩化ナトリウムを含む0.01Mのクエン酸ナトリウム水溶液 (pH 7.2) 500mlを用いた。

【0032】実施例1と同様にして、各精製工程におけるH C IIの回収率及び比活性を表2にまとめた。

【0033】

【表2】

工 程	H C II回収率 (%)	H C II比活性 (U/A _{280nm})
コーン分画法による上清Ⅱ+Ⅲの 0.4M-NaCl溶出画分	100	0.08
25% (w/v) PEG分画の 残渣	99.2	0.16
陰イオン交換クロマトグラフィー 0.15M-NaCl溶出液	56.1	1.45
陽イオン交換クロマトグラフィー 0.15M-NaCl溶出液	51.0	3.67
ゲルろ過による H C II画分 (第3画分) (第4画分)	23.9 28.4	8.40 10.46

【0034】実施例1と同様にして、H C II画分のSD S-PAGE分析を行ったところ、H C IIの第3及び第4画分は72kDであった。また、HPLC分析では純度99%以上を示した。

【0035】

【発明の効果】本発明の精製方法により、H C IIの回収 *

* 率が約52%以上となるとともに、ほぼ純品に近いものが回収されるから、工業的な大規模製造に適したものである。また、本発明のH C IIは、比活性が少なくとも約10U/A_{280nm}であり、有用な医薬品として臨床に供し得るものである。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. °	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K	1/22		C 0 7 K 14/47	
1/30			A 6 1 K 37/64	A C B
14/47				A D A

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09286797 A**

(43) Date of publication of application: **04.11.97**

(51) Int. Cl

C07K 14/745
A61K 38/55
A61K 38/55
C07K 1/16
C07K 1/18
C07K 1/22
C07K 1/30
C07K 14/47

(21) Application number: **08097040**

(22) Date of filing: **18.04.96**

(71) Applicant: **GREEN CROSS CORP:THE**

(72) Inventor: **URYU KATSUHIRO**
OMIZU AKIMASA
KAMIMURA YATSUHIRO

(54) HEPARIN COFACTOR II AND ITS PURIFICATION

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To purify a heparin cofactor II useful as a medicine, etc., having anticoagulant actions on an industrial scale by treating a solution containing a heparin cofactor II according to an anion exchange chromatography and then treating the resultant solution according to a cation exchange chromatography.

SOLUTION: This heparin cofactor II has at least about $10U/A_{280nm}$ specific activity. A human blood plasma is fractionated by a Cohn fractionating method to separate a combined supernatant II+III, which is then treated by a heparin affinity chromatography and a 0.01M aqueous solution of sodium citrate containing 0.4M sodium chloride (pH6.8) is then used to afford an eluted fraction containing a heparin cofactor II. The resultant solution containing the heparin cofactor II is subsequently passed through a column filled with a diethylaminoethyl (DEAE)-Sepharose (R), etc., and treated according to an anion exchange chromatography. An adsorbed fraction is then eluted, desalting and concentrated. The prepared

concentrate is subsequently passed through a column filled with a cation exchanger and treated according to a cation exchange chromatography to elute the adsorbed fraction, which is desalting to provide the objective heparin cofactor II having at least about $10U/A_{280nm}$ specific activity.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO